Annexin V-EGFP/PI 双染法细胞凋亡检测试剂盒

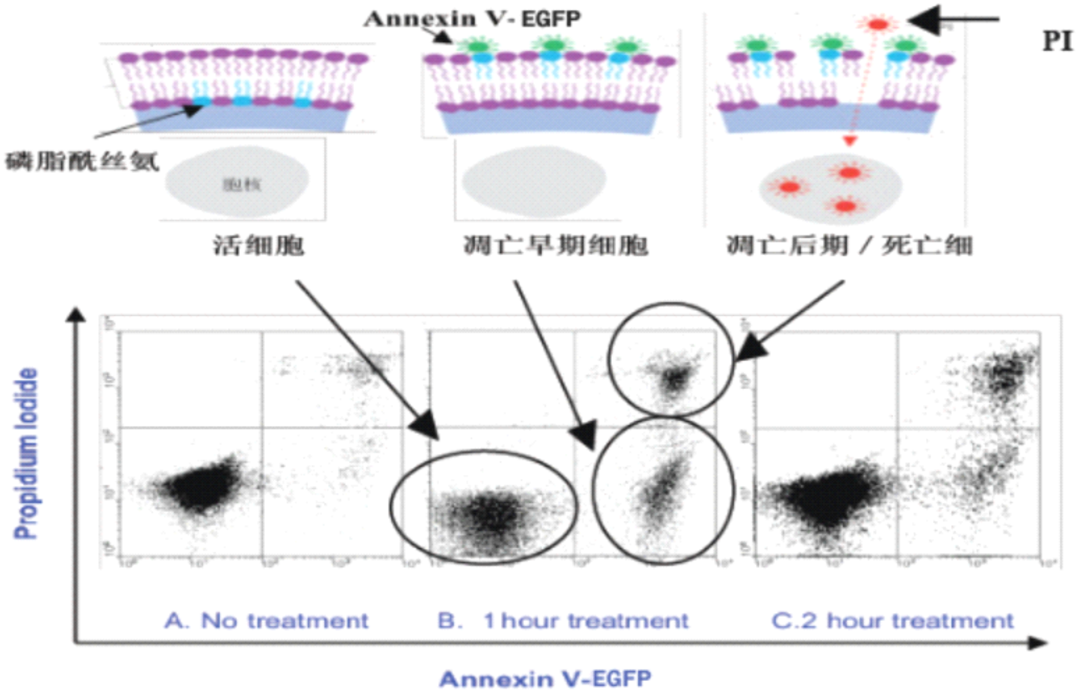
产品简介：

细胞凋亡普遍存在于生物界，是细胞的基本特征之一，对胚胎发育及形态发生、组织修复、内环境的稳定、机体的防御和免疫反应等方面都起到十分重要的作用。

Annexin V-EGFP/PI 细胞凋亡检测试剂盒(Annexin V-EGFP/PI Apoptosis Detection Kit)是用EGFP融合的重组人Annexin V来检测细胞凋亡时出现在细胞膜表面的磷酯酰丝氨酸的一种细胞凋亡检测试剂盒。可以使用流式细胞仪、荧光显微镜或其它荧光检测设备进行检测。Annexin V是一种分子量为35.8kD的Ca^{2+}依赖性磷脂结合蛋白，广泛分布于真核细胞胞浆内，参与细胞信号转导。Annexin V能与磷酯酰丝氨酸(phosphatidylserine，简称PS) 高亲和性特异地结合。在正常细胞中，PS主要分布在细胞膜内侧，在细胞发生凋亡的早期，细胞膜上的PS会外翻到细胞表面。用带有绿色荧光的Annexin V-EGFP标识出凋亡细胞。

本试剂盒还提供了碘化丙啶（Propidium Iodide，PI），PI可以染色坏死细胞或凋亡晚期丧失细胞膜完整性的细胞，呈现红色荧光。

综上所述，参考下图，用Annexin V-EGFP和碘化丙啶染色后，正常的活细胞不被Annexin V-EGFP和PI染色(如箭头指示)；凋亡早期的细胞仅被Annexin V-EGFP染色，PI染色呈阴性(如箭头指示)；坏死细胞和凋亡晚期的细胞可以同时被Annexin V-EGFP和PI双重染色(如箭头指示)，以区别凋亡早期细胞。



地址：上海市浦东新区张江高科技园区郭守敬路 199 号生物医药产业创新园　邮编：201203
电话：021-64197338　13761475994　021-50805522-2211/2213　传真：021-50805522-1150
Email：service@research-bio.com　　网址：www.research-bio.com

包装清单：

产品货号	产品规格	包装内容			
		Annexin V-EGFP	**1×Binding Buffer**	**PI**	使用说明书
CD003-1	25 assays	125ul	10ml	250ul	1 份
CD003-2	200 assays	1ml	80ml	2ml	1 份
CD003-3	1000 assays	200ml	400ml	10ml	1 份

保存条件：

4℃保存，Annexin V-EGFP、PI 染色液需避光保存，半年有效。若长期保存，可以把 PI 染色液适当分装后-20℃保存，Annexin V-EGFP 结合液可以直接-20℃保存。

需自备的试剂及仪器：

- PBS
- 蒸馏水或去离子水
- 水平离心机
- 流式细胞仪或荧光显微镜
- 移液器

使用说明：

A. 样品准备

1A. 对于悬浮细胞，在进行完细胞凋亡刺激后，1000g 离心 5 分钟。

1B. 对于贴壁细胞，把细胞培养液吸出至一合适离心管内（内含已经悬浮的发生凋亡或坏死的细胞），PBS 洗涤贴壁细胞一次，加入适量胰酶消化细胞。室温孵育至轻轻吹打可以使细胞吹打下来时，吸除胰酶，避免胰酶消化不够或消化过度。加入收集的细胞培养液，轻轻吹打均匀，转移到离心管内，1000g 离心 5 分钟。

✧ 注意：中晚期凋亡细胞因失去贴壁能力而悬浮于上清中，此部分细胞对于结果是否显著具有重大影响，不可任意丢弃，需离心收集后一起检测才能全面反映出细胞凋亡的整体情况。

✧ 注意：胰酶消化时细胞处理需要小心操作,尽量避免人为的损伤细胞。

地址：上海市浦东新区张江高科技园区郭守敬路 199 号生物医药产业创新园　邮编：201203
电话：021-64197338　13761475994　021-50805522-2211/2213　传真：021-50805522-1150
Email：service@research-bio.com　　网址：www.research-bio.com

2. 弃上清，用 1ml PBS 轻轻重悬细胞并计数（细胞数量不少于 10^5），然后 1000g 离心 5 分钟，收集细胞。

✧ 注意：PBS 洗涤细胞，洗掉残留的胰酶，否则残留的胰酶会消化并降解 Annexin V-EGFP，最终导致染色失败。

3. 加入 400μl 1×Binding Buffer 轻轻重悬细胞。
4. 加入 5μl Annexin V-EGFP，轻轻混匀，室温避光孵育 15 分钟。
5. 加入 10μl PI 染色液，轻轻混匀，冰浴避光放置 5 分钟。
6. 在 30 分钟内进行流式细胞仪检测，Annexin V-EGFP 为绿色荧光，PI 为红色荧光。
7. 如果用荧光显微镜下检测，则 1000g 离心 5 分钟，收集细胞，用 50-100μl 1×Binding Buffer 轻轻重悬细胞，涂片后，荧光显微镜下观察。

B. 流式细胞仪分析

流式细胞仪激发光采用激发波长 488nm，发射波长 530 nm 检测 EGFP 和>575 nm 检测 PI。Annexin V-EGFP 的绿色荧光通过 EGFP 通道（FL1）检测；PI 红色荧光通过 PI 通道（FL2）检测。细胞应可分成三个亚群：正常活细胞仅有很低的荧光强度，凋亡细胞有较强的绿色荧光，坏死细胞有绿色和红色荧光双重染色。

使用流式细胞仪正确分析 Annexin V-EGFP/PI 双染的细胞前要求仪器的荧光补偿来去除两种染料激发光之间的叠加，不同仪器之间的补偿不同。因此需要设置未处理的空白细胞和经 Annexin V-EGFP、PI 分别单染的细胞来调整荧光补偿去除光谱重叠。根据对上述 3 个对照的分析设定十字门的位置。

1. 上样未经染色的细胞，在线性 FS-SS 点图上显示细胞并设门圈出目标细胞群体，选定有效事件区域。 建立 FL1-FL2 双参数点图并分析以上散点图中设门的细胞，保证>98%的细胞处于在 X、Y 轴 Log1 为边界的左下象限中心区域。
2. 检测 Annexin V-EGFP 单染的细胞并检查 FL1-FL2 散点图，保证在左上和右上象限内没有颗粒。如果有颗粒出现在上端象限则说明有荧光渗漏；需降低 FL2 PMT 的电压，以有效地去除 FL2 的阳性信号。
3. 检测 PI 单染的细胞并检查 FL1-FL2 散点图，保证在右上和右下象限内没有颗粒。如果有颗粒出现在右侧象限则说明有荧光渗漏，需降低 FL1 PMT 的电压，以有效地去除 FL1 的阳性信号
4. 如果在以上调节补偿过程中更改了 PMT 的电压，建议重复 2、3 步骤。.

地址：上海市浦东新区张江高科技园区郭守敬路 199 号生物医药产业创新园 邮编：201203
电话：021-64197338 13761475994 021-50805522-2211/2213 传真：021-50805522-1150
Email：service@research-bio.com 网址：www.research-bio.com

注意事项：

- 该试剂盒只能检测活细胞，而不能用于切片、擦刮、固定或浸润细胞样品的检测。
- 细胞凋亡是一种持续变化的动态过程，选择合适的诱导时间对观察凋亡比较重要。染色后宜尽快检测，时间过长可能会导致凋亡或坏死细胞的数量增加。
- 如果有细菌或真菌污染，会严重影响检测效果。
- PBS 洗涤细胞，洗掉残留的胰酶，否则残留的胰酶会消化并降解 Annexin V-EGFP，最终导致染色失败。
- 荧光物质均易发生淬灭，在进行荧光观察时，尽量缩短观察时间，同时在操作和存放过程中也尽量注意避光保存。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
- 检测血液样品时，如果含有血小板，请使用含有 EDTA 的缓冲剂并 200×g 离心洗去血小板。因为血小板含有 PS，能与 Annexin V 结合，从而干扰实验结果。
- 旋帽离心管装的试剂在开盖前请短暂离心，将盖内壁上的液体甩至管底，避免开盖时液体洒落。
- Annexin V-EGFP 和 PI 是光敏物质，在操作时请注意避光。

地址：上海市浦东新区张江高科技园区郭守敬路 199 号生物医药产业创新园　邮编：201203
电话：021-64197338　13761475994　021-50805522-2211/2213　传真：021-50805522-1150
Email：service@research-bio.com　　网址：www.research-bio.com